



TITLE:

Studies on the Separation of Geometrical Isomers of 2,4-Dinitrophenylhydrazones of Some Aliphatic α -Keto Acids and Quantitative Determination of α -Keto Acids(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kawano, Chizuko

CITATION:

Kawano, Chizuko. Studies on the Separation of Geometrical Isomers of 2,4-Dinitrophenylhydrazones of Some Aliphatic α -Keto Acids and Quantitative Determination of α -Keto Acids. 京都大学, 1962, 農学博士

ISSUE DATE:

1962-12-18

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/210999>

RIGHT:

氏 名	河 野 千 鶴 子 かわ の ち づ こ
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	論 農 博 第 1 1 号
学位授与の日付	昭 和 37 年 12 月 18 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on the Separation of Geometrical Isomers of 2,4-Dinitrophenylhydrazones of Some Aliphatic α-Keto Acids and Quantitative Determination of α-Keto Acids (脂肪族 α -ケト酸 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの幾何異性体の分離ならびに α -ケト酸の定量に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 館 勇 教 授 中 島 稔 教 授 緒 方 浩 一

論 文 内 容 の 要 旨

ピルビン酸や α -ケトグルタル酸などの α -ケト酸は、その 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン（以下ヒドラゾンと略称する）として定量するのが最近の方法であるが、そのヒドラゾンにはシス型とトランス型とが存在するため、正確な分析値を得ることが困難である。

著者はこの点にかんがみ、数種の α -ケト酸を合成し、そのヒドラゾンにつき、シスおよびトランス両型の異性体を分離し、それぞれの性質および異性化反応などに関して詳細な研究を行ない、その結果にもとづいて α -ケト酸の新しい定量法を確立した。本論文はその成果をまとめたものであって、4章にわたって論述している。

第1章は緒論である。本章においては α -ケト酸の定量に関する多くの研究を歴史的に述べ、現在もっとも広く用いられているヒドラジン法に関して考察し、その不備の点を指摘するとともに著者の得た成果と比較して、本研究の目的とする問題点について論じている。

第2章には α -ケト酸ヒドラゾンの異性体の分離に関する研究結果が述べられている。

著者は9種の α -ケト酸を合成し、そのヒドラゾンを作り、それに含まれるシス、トランス両型異性体の分離を行ない、異性化の条件を調べ、さらに得られた両異性体の性質を Na_2CO_3 溶液に対す溶解度、融点の測定、ペーパークロマトグラフ法、ポアログラフ法、可視および赤外吸収スペクトル法によって調査した。その結果、著者の合成した α -ケト酸は次の2群に分けられることを指摘した。

A 群: $\text{RCH}_2\text{COCO}_2\text{H}$ の一般式をもつもの

B 群: $\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{array} \text{CHCOCO}_2\text{H}$ あるいは $\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \\ \text{R}' \end{array} \text{CCOCO}_2\text{H}$ の一般式をもつもの

A 群に属する α -ケト酸のヒドラゾンはペーパークロマトグラフ法でシス型およびトランス型の2個の

スポットを与え、シス型の R_f はトランス型のそれよりも大きいことを指摘した。両異性体の生成する割合は反応条件によって異なることも明らかにした。たとえば、ピルビン酸の場合、反応後1分間で約23%のシス型が生成されるが、シス型は反応液の H^+ の触媒作用によって、次第にトランス型に移行し、平衡状態においてはシス型は7%に減少した。またケト酸分子の炭素鎖の長いもの程平衡状態においてシス型が多いことを認めた。

A群の α -ケト酸ヒドラゾンにおける両異性体の分離はトランス型が Na_2CO_3 溶液に易溶、シス型が難溶という溶解度の差を利用した。たとえば、トランス型の分離、精製には Na_2CO_3 溶液可溶部をとり、これに 1N HCl を加えて微酸性としてトランス型ヒドラゾンを分離、0.2N HCl でよく洗浄の後、アセトンを含むベンゼンにて再結精製し、ペーパークロマトグラフ法でその純度を確認した。また、シス型はトランス型を分離した Na_2CO_3 溶液不溶部から分離した。シス型のものは一般に含有量が少ないから、もしシス型を多量に得たい場合はトランス型からシス型に異性化させなければならない。異性化につき研究の結果、酸を含む有機溶媒処理がもっともよいことを知った。たとえば、その方法は 6N HCl を飽和した酢酸エチルにヒドラゾンを溶解して冷所に暫時放置するとトランス型はシス型に相当量異性化することを明らかにした。異性化した溶液からシス型を分離するには 1N Na_2CO_3 溶液を加えてシス型を不溶性のナトリウム塩として分離し、これを 1N HCl で処理して、シス型ヒドラゾンを遊離形にし、ろ過、水洗乾燥する。シス型ヒドラゾンの遊離形はトランス型になりやすいから、その操作は低温でかつ迅速に行なわなければならない。また、アセトンを含むベンゼンで再結晶する場合も同様の注意が肝要であることを明らかにした。

融点を常法により浴温を徐々にあげて測定すると両異性体の間に差のない場合が多いが、あらかじめ加温した浴につけて急熱するとトランス型は常にシス型よりはるかに低温で溶融することを指摘した。そして徐々に熱した場合の現象は異性化によるものであることをペーパークロマトグラフ法で確認した。

B群に属するケト酸のヒドラゾンはペーパークロマトグラフ法で1個のスポットしか示さず、溶液状態から塩析法によっても両異性体を分離することができなかった。ただ再結晶の場合に、溶媒を変えると融点を異にする2種の異性体を得られた。著者はこれをX型、Y型と呼んだが、この両型は溶解度、分配係数、吸収スペクトルおよびポーラログラフ半波電位に差異を認めず、全く同一の行動を示すことを明らかにした。

第4章にはヒドラジン法による α -ケト酸の定量法に関する研究結果が述べられている。

天然物中にもっとも普遍的に存在する α -ケト酸はピルビン酸と α -ケトグルタル酸である。したがってこれらのケト酸を定量する方法は多いが、もっとも広く用いられている方法がヒドラジン法である。すなわち、 α -ケト酸の2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンを作り、これを酢酸エチルで抽出、この抽出液を Na_2CO_3 溶液で処理してヒドラゾンを Na_2CO_3 溶液に転溶させ、これに NaOH を加えて発色する赤色を測定するのが定量法の原理である。第2章で明確にしたように例をピルビン酸にとると、そのヒドラゾンにはシス型およびトランス型両異性体を含み、シス型は Na_2CO_3 溶液に不溶であるから正確な定量値が得られない。よって正確な値を得るために、定量に用いる試薬、反応の条件、抽出の条件、測定に用いる波長、除たんぱく剤などにつき詳細な研究を行ない、従来の方法よりもすぐれた新しい定量法を確立した。

定量に用いる波長は $417\text{m}\mu$ がよく、天然物を取扱う場合の除たんぱく剤としてはメタリン酸がすぐれていること明らかにした。

ピルビン酸のみを含む試料中のそれを定量する場合、必要あれば除たんぱく後酢酸エチルで抽出する。ついでこの抽出液からピルビン酸を Na_2CO_3 溶液で抽出する際、石油エーテルを一定量添加してピルビン酸を完全に Na_2CO_3 溶液に移行させることに成功した。その後、これに NaOH を加えて発色する赤色を測定する方法を確立した。

さらに、ピルビン酸は α -ケトグルタル酸と共存する場合が多い。著者はこの両者を分離定量する方法を研究した。その方法の骨子はヒドラゾンの酢酸エチル抽出液を一定量の Na_2SO_4 を含む Na_2CO_3 溶液で処理し、塩析効果によりピルビン酸を酢酸エチル層にのこし、 α -ケトグルタル酸だけを Na_2CO_3 溶液層に移して両者を分離することである。

この方法による定量法を詳細に吟味し、納豆中のピルビン酸および α -ケトグルタル酸を定量した。

高級ケト酸の場合はヒドラゾンを酢酸エチルで抽出するよりもベンゼンを用いて抽出するのがよく、ついで Na_2CO_3 溶液で処理するよりも NaHCO_3 溶液で処理してヒドラゾンをこれに転溶して、 NaOH で発色定量するほうが満足な結果を得た。

第4章は研究成果の総括である。

次に参考論文4編のうち、納豆生成時におけるたんぱく分解過程に関する研究(2編)では水溶性窒素化合物の消長、各種アミノ酸類の検出ならびにその消長について研究結果をのべ、他の2編は納豆中の有機酸類の検索に関する研究で、多くの有機酸をペーパークロマトグラフ法で検出している。

論文審査の結果の要旨

α -ケト酸ことにピルビン酸および α -ケトグルタル酸は生体中に広く分布し、糖の代謝中間物質として生化学上重要な物質である。したがって、その定量に関しては多くの研究があるが、現在2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法が広く用いられている。しかるに、この方法が α -ケト酸の定量法として不満足な点は、そのヒドラゾンにシスおよびトランス両型の異性体が存在し、それによって生ずる誤差があるからである。したがって性質の異なる両異性体が共存していても定量し得る方法の確立が望ましいところである。

著者は多くの α -ケト酸を合成し、そのヒドラゾンにつきシスおよびトランス両型を単離、純化して、それぞれの性質を詳細に検討して、多くの新しい知見を得た。ついでこれらの基礎的研究結果を用いて α -ケト酸に対する従来の定量法を検討し、その方法を改良して、新しいケト酸の定量法を確立したばかりでなく、ピルビン酸と α -ケトグルタル酸の共存物からそれぞれを分離定量することに成功したことは、生化学ならびに食品分析化学に貢献するところ大である。

また、参考論文4編は納豆に関する研究で興味ある成果を挙げている。

よって本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。